

PERAMPANEL PLASMATICO IN FLUORIMETRIA - FAST - Codice Z79210

INTRODUZIONE

Il Perampanel è un farmaco antiepilettico che agisce in modo selettivo sui recettori AMPA (α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolone propionato), i quali hanno un ruolo centrale nella generazione e nella diffusione delle crisi epilettiche. Come antagonista del recettore AMPA, il Perampanel agisce sulle crisi epilettiche bloccando gli effetti del neurotrasmettitore glutammato, principale causa delle crisi.

Il Perampanel è indicato per il trattamento aggiuntivo di crisi epilettiche parziali, con o senza generalizzazione secondaria e per il trattamento aggiuntivo di crisi tonico-cloniche generalizzate primarie, in pazienti dai 12 anni di età.

Il trattamento del paziente epilettico richiede il contributo multidisciplinare di competenze mediche, farmacologiche, psicologiche e sociali. In questo contesto pertanto, la terapia farmacologica e il conseguente monitoraggio rivestono un ruolo decisivo nel controllo immediato delle crisi epilettiche e nella prevenzione a medio e lungo termine delle ricadute.

Attualmente, grazie al monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci antiepilettici, è in molti casi possibile modellare la terapia sul singolo paziente.

Il presente metodo consente di determinare la concentrazione sieriche e/o plasmatica del Perampanel mediante HPLC-Fluorimetria.

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

Release N° 001	Perampanel plasmatico in Fluorimetria - FAST	Gennaio 2016
----------------	--	--------------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo :

Il Perampanel viene isolato trattando il plasma o il siero con un opportuno deproteinizzante. Dopo l'aggiunta di uno stabilizzante, la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

Recupero del Metodo : >98%

Sensibilità del Metodo : 0,003 ug/ml

Minima concentrazione analizzabile : 0,01 ug/ml

Linearità : 0,01 – 8 ug/ml

Accuratezza intra serie (errore relativo %):

Ci	Cs
0,05 ug/ml	0,8 ug/ml
5,4%	3,3%

Accuratezza inter serie (errore relativo %):

Ci	Cs
0,05 ug/ml	0,8 ug/ml
7,8%	4,1%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %):

Cl	Cm	Ch
0,01 ug/ml	0,2 ug/ml	1,5 ug/ml
5,8%	5,7%	3,9%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %):

Cl	Cm	Ch
0,01 ug/ml	0,2 ug/ml	1,5 ug/ml
12,6%	6,1%	4,7%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std 0,9973 ± 0,0006

Range di normalità nel plasma : 0,1 – 1 ug/ml

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2-8 °C.

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante con Standard Interno, **1 x 30 ml**

Reagente B – Soluzione Stabilizzante, **1 x 30 ml**

Reagente C – Soluzione Test, **1 x 1 ml**

Calibratore liofilo plasmatico, **1 x 1 ml**

Reagente M – Fase Mobile, **2 x 500 ml**

Codice Z79216 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 5 μ l
Detector Fluorimetrico λ_{Ex} = 290 nm λ_{Em} = 430 nm
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di prelievo ematico :

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza gel per il siero e con Eparina come anticoagulante per il plasma.
Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti.
Separare il siero e stoccarlo a - 20 °C. Stabile 4 settimane.

PROCEDURA PREANALITICA

In una provetta pipettare :

- 950 µl di H₂O di grado HPLC
- 50 µl di **Reagente C - SoluzioneTest**

Al Vortex per 10 secondi

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 5 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione dei singoli Antiepilettici che deve essere simile a quello riportato in fig. 1. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei Campioni

Dispensare in provette coniche da 1,5 ml tipo Eppendorf con tappo :

	Calibratore	Campione	Controllo
Calibratore	100 µl		
Campione		100 µl	
Controllo			100 µl
Reagente A - Deproteinizzante con Standard Interno	300 µl	300 µl	300 µl

Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 10 secondi

FASE 2 : Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti.

FASE 3 : Trasferire 100 µl del sovranatante limpido in una provetta.

- Aggiungere a ciascuna provetta 300 µl di **Reagente B – Sol. Stabilizzante**

Al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 2 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 5 µl della soluzione nel cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

Release N° 001	Perampanel plasmatico in Fluorimetria - FAST	Gennaio 2016
-----------------------	---	---------------------

PERAMPANEL - Avvertenze

REAGENTE C: SOLUZIONE TEST

PERAMPANEL	circa 0,25 mg/l
------------	-----------------

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

λ_{Ex}	290 nm
λ_{Em}	430 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica POROSHELL 120 EC-C18 4,6 x 50 mm, 2,7 μ m, è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* POROSHELL 120 EC-C18 4,6 x 50 mm, 2,7 μ m. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v)** e successivamente 30 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (80 : 20 v/v)** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare il Test chimico e verificare la congruità della separazione. **E' possibile effettuare analisi a ricircolo di fase, purchè si abbia l'accortezza di filtrare la stessa Fase Mobile con filtro da 0,22 μ prima di ogni seduta analitica.** Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 15 ml di una soluzione di **H₂O : Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v)** al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare. Flussare una soluzione di **H₂O : Metanolo o Acetonitrile (30 : 70 v/v)** per 30 minuti scaricandola. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della colonna alla fine di ogni seduta analitica.**

STOCCAGGIO DELLA COLONNA

Stoccare la colonna pulita nella soluzione di lavaggio **H₂O : Metanolo o Acetonitrile (30 : 70 v/v)**.

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

L'ago di iniezione va lavato con una soluzione di **H₂O : Metanolo o Acetonitrile o Etanolo (80 : 20 v/v)**.

PARAMETRI HPLC

LOOP	5 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,0 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 96 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z79216	Calibratore per Perampanel plasmatico	4 x 2 ml
Z79217	Controllo per Perampanel plasmatico – Livello 1	5 x 2 ml
Z79218	Controllo per Perampanel plasmatico - Livello 2	5 x 2 ml
Z79219	Controllo per Perampanel plasmatico - Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
Z699975902	Colonna Analitica POROSHELL 120 EC-C18 (4,6 x 50 mm, 2.7 µm)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
S51820717	Tappi per Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ



PERAMPANEL PLASMATICO FAST
(Cromatogrammi di Riferimento)

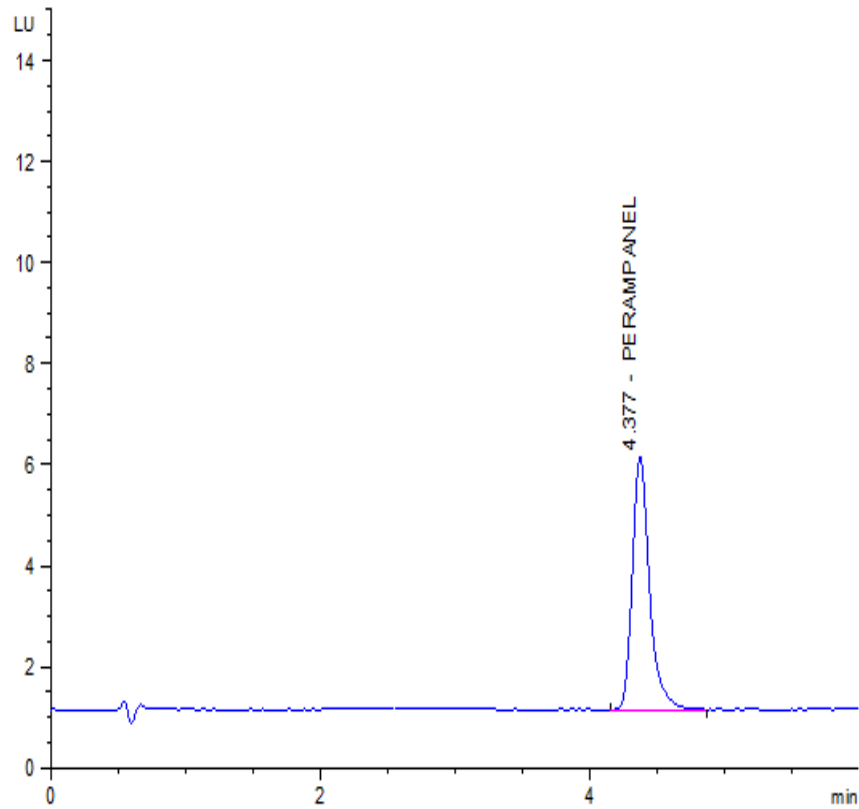


Fig. 1 :	Soluzione Test
	R.T. 4.37 Perampanel

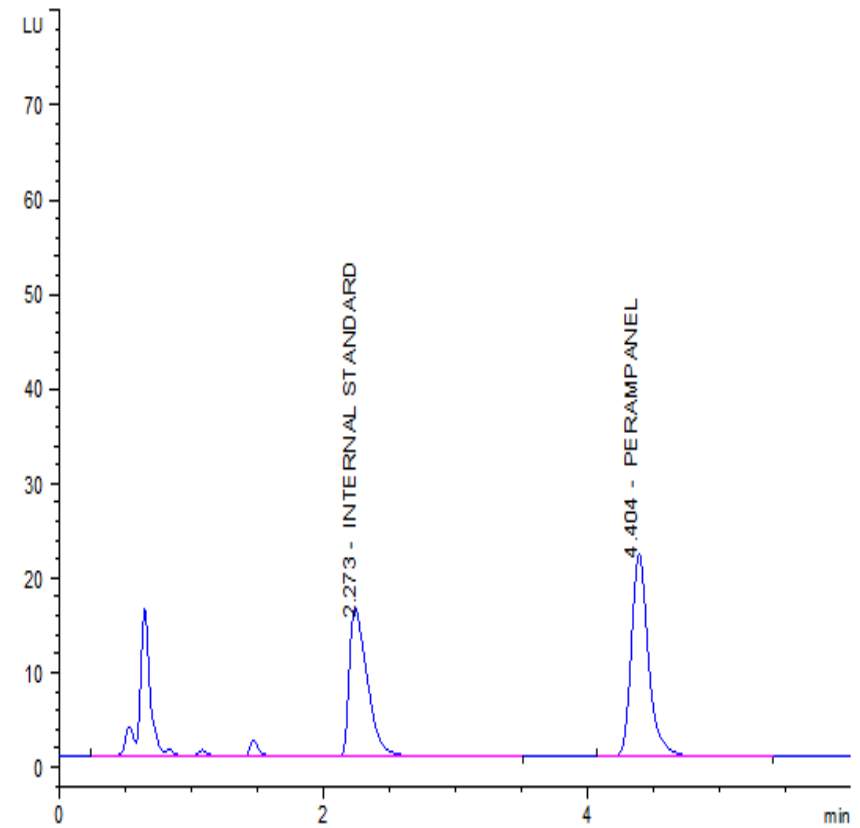


Fig. 2 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.27 Standard interno
	R.T. 4.40 Perampanel 0,8 ug/ml

PERAMPANEL PLASMATICO FAST

(Cromatogrammi di Riferimento)

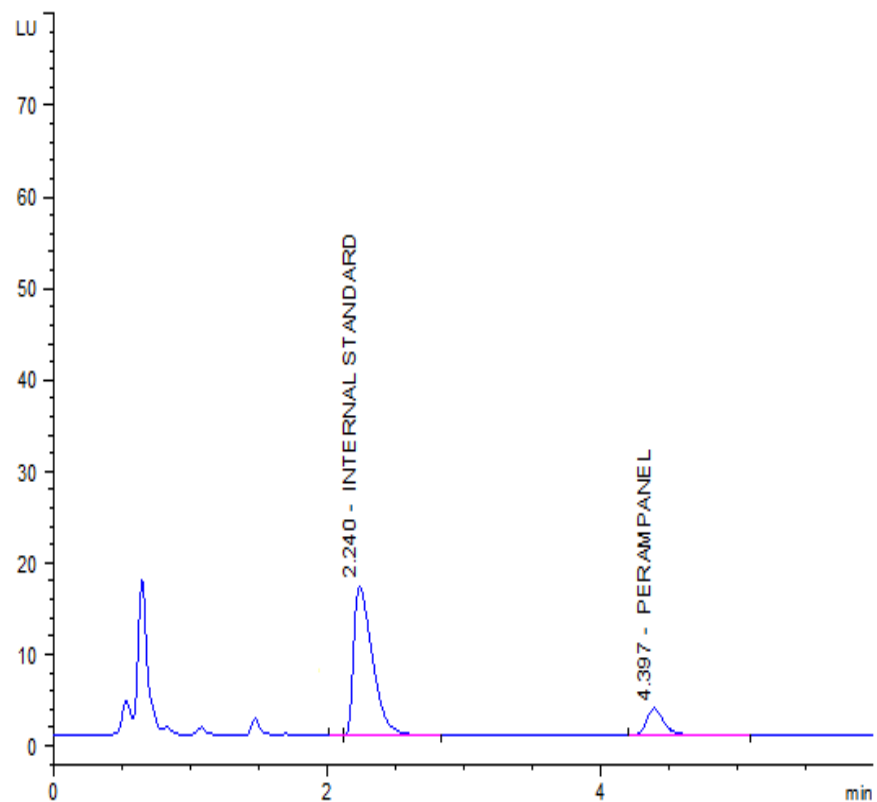


Fig. 3 :	Controllo basso
	R.T. 2.24 Standard interno
	R.T. 4.39 Perampanel 0,1 ug/ml

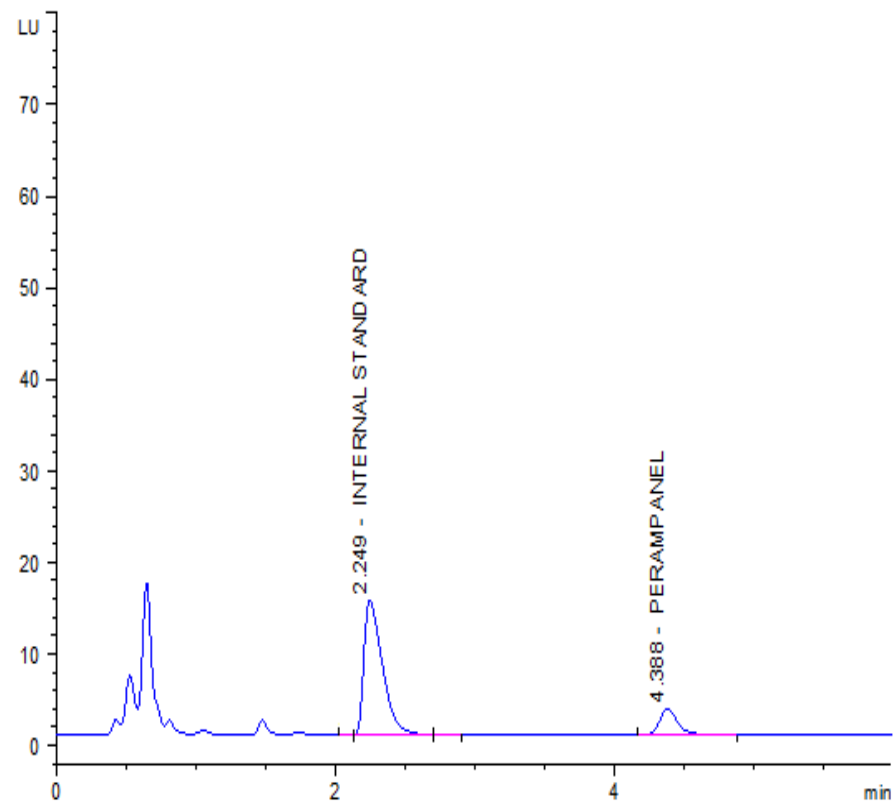


Fig. 4 :	Campione plasmatico
	R.T. 2.24 Standard interno
	R.T. 4.38 Perampanel 0,11 ug/ml